## (19) 世界知的所有権機関 国際事務局



# 

#### (43) 国際公開日 2003 年9 月18 日 (18.09.2003)

**PCT** 

#### (10) 国際公開番号 WO 03/076628 A1

福田町蛭池276-1 サンハイツ蛭池C号 Shizuoka

(JP). 渡辺哲 (WATANABE,Satoshi) [JP/JP]; 〒418-0022

静岡県 富士宮市 小泉 1 8 9 0-3 Shizuoka (JP). 河合清 (KAWAI, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒437-0031 静岡県 袋井市

愛野 1 5 7 0 Shizuoka (JP). 清水 力 (SHIMIZU,Tsutomu) [JP/JP]; 〒439-0035 静岡県 小笠郡菊川町平尾

1 1 4 Shizuoka (JP). 永山 孝三 (NAGAYAMA,Kozo)

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/31, 15/60, C07K 14/47, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/48

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/01980

(22) 国際出願日:

2003年2月24日(24.02.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-66955 2002年3月12日(12.03.2002) JF

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): クミアイ化学工業株式会社 (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒110-8782 東京都台東区池之端 一丁目 4番 2 6号 Tokyo (JP).

[JP/JP]; 〒436-0004 静岡県 掛川市 八坂 2 3 8 4 - 4 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒 105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

森ビル 3階 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 角 康一郎 (KAKU,Koichiro) [JP/JP]; 〒437-1207 静岡県 磐田郡 2文字コード及び他の略語については、定期発行される 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語 のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SCYTALONE DEHYDROGENASE GENE SHOWING TOLERANCE TO AGRICULTURAL PESTICIDE

(54)発明の名称:農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a gene which is widely usable in studies on tolerant rice blast fungus *Pyricularia oryzae*, etc. A gene encoding the following protein (a) or (b): (a) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. (b) A protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 by deletion, substitution or addition of one or more amino acids and showing a scytalone dehydrogenase activity in the presence of a scytalone dehydrogenase inhibitor.

(57) 要約: 耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することが出来る遺伝子を提供する。 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。(a)配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。





#### 明細書

### 農業用殺菌剤に対して耐性を示すシタロン脱水酵素遺伝子

#### 技術分野

本発明は、イネに発症するいもち病の原因菌として知られているいもち病菌におけるシタロン脱水酵素をコードする遺伝子に関する。

#### 背景技術

いもち病菌 (Pyricularia oryzae, Magnaporthe grisea) によって引き起こされるイネいもち病はイネを栽培しているほとんどの国で認められているが、特に日本をはじめとする高温多湿な気候の地域では、農業上重大な病気の一つに挙げられる。従って高収量の稲作を達成するためには、イネいもち病の防除は必要不可欠である。近年、治療効果を持つ薬剤に代わり、予防効果のある箱処理型の薬剤の使用によって、いもち病菌防除における農家の労力が省力化される傾向にある。このような剤としてカルプロパミド (carpropamid; ((1RS, 3SR)-2, 2-dichloro-N-((R)-1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)) に代表されるシタロン脱水酵素 (以下、SCDH) 阻害剤を挙げることができる (Kurahashi et al., J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998; Motoyama et al., J. Pestic. Sci, 23, 58-61, 1998)。SCDH はメラニン生合成経路におけるシタロンから 1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレン(以下 1, 3, 8-THN)への脱水反応を触媒する酵素である。

いもち病菌がイネ葉表面のクチクラ層を破り侵入する際、感染特異的器官である付着器中のグリセロール濃度を 80 気圧にも上昇させるが、このグリセロールを付着器中に閉じこめるために細胞壁のメラニン層が必要不可欠となる(鎌倉ら、化学と生物、39、340-347、2001)。メラニンの生合成が阻害されると、付着器が形成できなくなる。従って SCDH 阻害剤は直接的に殺菌力を示す薬剤ではなく、病原性を抑えることで防除活性を現わす非殺菌性の薬剤である。

糸状菌のSCDH遺伝子については、最初にPyricularia oryzaeで解明されたが、

その塩基配列は公開されずに SCDH タンパク質の 3 次元構造だけが報告された(Landquist et al., Structure, 2, 937-944, 1994)。その後、Colletorichum lagenarium (ウリ類炭素病菌) (Kubo et al., Appl. Environment. Microbiol, 62, 4340-4344, 1996; アクセッション番号 D86079)で報告され、続いて、Aspergillus fumigatus (Tsai et al., Mol. Microbaiol, 26, 175-183, 1997; アクセッション番号 U95042)、Pyricularia oryzae (Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1998; アクセッション番号 AB004741)そして Ophiostoma floccosum (Wang et al., アクセッション番号 AF316575)で報告されている。また、カルプロパミドが結合した SCDH タンパク質の 3 次元構造についても報告されている (Nakasako et al., Biochemistry, 37, 9931-9939, 1998; Wawrzak et al., Proteins: Struct. Func. Genet, 35, 425-439, 1999)。

#### 発明の開示

ところで、近年、カルプロパミド等の SCDH 阻害剤に対する感受性が低下したいもち病菌 (以下、「耐性いもち病菌」と称する。)が見出された。上述したように、カルプロパミド等の SCDH 阻害剤は稲作において非常に重要な薬剤であるため、耐性いもち病菌における感受性決定要因を究明し、且つ、耐性いもち病菌の防除対策を立てることは、安定した稲作を継続する上で非常に重要である。

しかしながら、耐性いもち病菌における感受性決定要因の解明や、耐性いもち病菌の生息地域の特定等、耐性いもち病菌に関する研究はほとんどなされていないのが現状である。

上述した目的を達成するために、本発明者が鋭意検討した結果、耐性いもち病菌における感受性決定要因を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を包含する。

- (1) 以下の(a) 又は(b) のタンパク質をコードする遺伝子。
- (a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。



- (2) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから 1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする(1) 記載の遺伝子。
- (3) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする(1) 記載の遺伝子。
  - (4)(1)記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素。
  - (5)(1)記載の遺伝子を含む組換えベクター。
  - (6)(5)記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。
- (7) 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感受性評価方法。
- (a)評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、 配列番号4に示すアミノ酸配列の75番目のバリンに相当するアミノ酸を同定す る工程。
- (b) 上記(a) 工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水 酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。
- (8)上記(b)工程では、上記(a)工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする(7)記載の感受性評価方法。
  - (9)(4)記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。
- (10)配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当する アミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備える、 シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。
- (11)配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当する アミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱 水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る遺伝子は、シタロン脱水酵素阻害剤(以下、SCDH 阻害剤)の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すシタロン脱水酵素(以下、「変異 SCDH 酵素」と



呼ぶ)をコードするものである。なお、以下の説明において、SCDH 阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性が低下するシタロン脱水酵素を、単に SCDH 酵素或いは野生型 SCDH 酵素と呼ぶ。

SCDH 阻害剤としては、例えば、カルプロパミド (carpropamid; (2, 2-dichloro -N-(1-(4-chlorophenyl)ethyl)-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide)、フェノキサニル (1-(2, 4-dichlorophenyl)oxy-N-(1-cyano-1, 2-dimethyl)propylet hanecarboxamide)、ジクロシメット (N-[1-(2, 4-dichlorophenyl)ethyl]-1-cyan o-2, 2-dimethylpropanecarboxamide) 等が挙げられる。SCDH 阻害剤は、通常、いもち病菌のイネに対する感染阻害剤として使用され、SCDH 酵素の活性を阻害する。具体的に、SCDH 酵素は、図1に示すメラニン生合成経路において、シタロンから1,3,8-トリヒドロキシナフタレン(以下、「1,3,8-THN」と呼ぶ)への脱水反応、及び、バーメロンから1,8-ジヒドロキシナフタレンへの脱水反応を触媒する。

SCDH 阻害剤は、この SCDH 酵素の活性を阻害することによって、いもち病菌における付着器の形成を阻害し、イネに対する病原性を抑制することができる。すなわち、SCDH 阻害剤は、いもち病菌の感染力を低下させることによって、いもち病の発生を防止する。これに対して、変異 SCDH 酵素は、SCDH 阻害剤の存在下であっても、上述した酵素活性を示すことによって、いもち病菌に対して SCDH 阻害剤に対する抵抗性を付与している。したがって、変異 SCDH 酵素を発現するいもち病菌(以下、「耐性いもち病菌」又は「抵抗性株」と呼ぶ)は、SCDH 阻害剤の存在下であってもメラニン生合成が阻害されず、付着器を形成することができ、イネ葉表面のクチクラ層を破り侵入することができる。すなわち、耐性いもち病菌は、SCDH 阻害剤の存在下であっても高い感染力を示す。

変異 SCDH 酵素としては、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるものが挙げられる。 また、変異 SCDH 酵素は、配列番号 2 のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸 が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻 害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すものであってもよい。ここで、1 以 上とは、例えば、1~30個、好ましくは、1~20個、より好ましくは、1~ 10個を意味する。

野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素における酵素活性は、シタロンから 1, 3, 8-THN への脱水反応、或いは、バーメロンから 1,8-ジヒドロキシナフタレンへの脱

水反応を測定することによって評価できる。すなわち、野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素と基質(シタロン又はバーメロン)とを含む反応溶液で酵素反応を進行させ、基質の減少量及び/又は反応産物(1,3,8-THN 又は 1,8-ジヒドロキシナフタレン)の増加量を測定することによって、野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素の酵素活性を評価できる。

具体的には、シタロンから 1,3,8-THN への酵素反応を分光的に測定することができる。例えば、シタロンの減少量を測定するには、Motoyama et al., J. Pest ic. Sci, 23,58-61,1998 に準じて行うことができる。

一方、1,3,8-THN の増加量は、基質であるシタロンと生成物である 1,3,8-THN のそれぞれの UV 吸収スペクトル(図 2 に示す)から、200~300nm では 1,3,8-TH N の吸収はシタロンの吸収と被さっているが、340~360nm ではシタロンの吸収がほとんど無視できるため、340~360nm での UV 吸収スペクトルで測定することができる。なお、340~360nm での UV 吸収スペクトルで測定する方法では、酵素反応を 100 秒間測定することによるレートアッセイにより行うことにより、SCDH 阻害剤に対する野生型 SCDH 酵素又は変異 SCDH 酵素の感受性を測定することができる。

この方法によれば、所定の濃度で SCDH 阻害剤(例えばカルプロパミド)を添加した反応溶液において酵素反応を進行させ、340~360nm での UV 吸収スペクトルを測定することによって、反応産物である 1,3,8-THN の合成量を測定できる。そして、測定した 1,3,8-THN の合成量を、SCDH 阻害剤の非存在下における 1,3,8-THN の合成量で除算することによって、SCDH 阻害剤の当該濃度における阻害率とする。そして、野生型 SCDH 酵素及び変異 SCDH 酵素について、SCDH 阻害剤の濃度を変化させて阻害率を測定し、各酵素における I50 値を算出する。野生型 SCDH 酵素の I50 値と変異 SCDH 酵素の I50 値とから、R/S 比を算出することによって、変異 SCDH 酵素における SCDH 阻害剤に対する感受性を評価することができる。例えば、算出した R/S 比が 2 以上である場合、変異 SCDH 酵素は野生型 SCDH 阻害剤と比較して、SCDH 阻害剤に対する感受性が低いと定義できる。

なお、変異 SCDH 酵素の酵素活性は、上述した方法に限定されず、如何なる方法 を適用して測定しても良い。変異 SCDH 酵素の酵素活性方法としては、例えば、酵 素反応生成物である 1, 3, 8-トリヒドロキシナフタレンの HPLC による分析定量 等を用いた方法を例示することができる。

変異 SCDH 酵素をコードする遺伝子(以下、「変異 SCDH 遺伝子」と呼ぶ)は、上述した変異 SCDH 酵素をコードする塩基配列を含むものであれば、イントロンを含むゲノム DNA から得たものでも良いし、イントロンを含まない cDNA から得られたものであっても良い。

変異 SCDH 遺伝子は、例えば、いもち病菌の SCDH 酵素の cDNA 配列から設計したプライマーと、SCDH 阻害剤に抵抗性を示すいもち病菌(以下、「耐性いもち病菌」と呼ぶ)のゲノム DNA とを用いた PCR によって得ることができる。また、変異 SC DH 遺伝子は、上記プライマーと、耐性いもち病菌から抽出した mRNA とを用いた R T-PCR によって得ることもできる。なお、いもち病菌の SCDH 酵素の cDNA 配列は公知であり、Motoyama らの Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988 (DN A データバンク、アクセッション番号 AB004741) に記載されている。

このような方法によって得られた変異 SCDH 遺伝子は、例えば、配列番号 1 に示すような塩基配列を含んでいる。変異 SCDH 遺伝子及び野生型 SCDH 酵素をコードする遺伝子(以下、SCDH 遺伝子と呼ぶ)の塩基配列(cDNA)を比較した結果を図3に示す。また、ゲノム DNA における変異 SCDH 遺伝子及び SCDH 遺伝子の塩基配列を比較した結果を図4に示す。図3及び図4に示すように、変異 SCDH 遺伝子においては、SCDH 遺伝子における223番目のG(グアノシン)がA(アデノシン)にホモに変異している。この変異は、野生型 SCDH 酵素における75番目のバリン(Va1)がメチオニン(Met)へ変異することを意味している。

また、変異 SCDH 遺伝子及び SCDH 遺伝子の塩基配列を比較した結果、変異 SCDH 遺伝子においては、450 番目の T (チミジン) が C (シチジン) に変異していた。 但し、この変異はアミノ酸変異を伴っていない。

また、図3及び図4の比較から、変異 SCDH 遺伝子は、変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列における 42番目及び 43番目の間と 141番目及び 142番目の間とに、それぞれ 81塩基と約 89塩基のイントロンを有している。なお、後者のイントロン(変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列における 141番目及び 142番目の間)はポリ A 鎖が連なっていたため、PCR を行った際、長さの異なるものが生成してきてしまい明確な長さを決定できなかったため、約 89塩基となっている。

変異 SCDH 遺伝子としては、配列番号1の塩基配列には限定されず、配列番号2

のアミノ酸配列からなるタンパク質、或いは、配列番号2のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列であればいかなるものであってもよい。このような塩基配列としては、例えば、配列番号1の塩基配列において、アミノ酸変異を伴わない塩基置換が生じた塩基配列を挙げることができる。

また、変異 SCDH 遺伝子としては、配列番号 1 の塩基配列に相補的な塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列であって、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質をコードする塩基配列からなるものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、 $10\text{mM}\sim300\text{mM}$ 、好ましくは  $20\sim100\text{mM}$  であり、温度が  $25^{\circ}\sim70^{\circ}$ 、好ましくは  $42^{\circ}\sim55^{\circ}$ での条件をいう。

変異 SCDH 遺伝子は、例えば、SCDH 阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から得られたゲノム DNA を鋳型とし、所定の配列を有する一対のプライマーを用いた PCR によって得ることができる。ゲノム DNA の調製法としては、何ら限定されないが、例えば、CTBA (cetyltrimethylammonium bromide)を抽出液として用いる方法、SDS/フェノール又はフェノール/クロロホルム抽出による方法、また市販のキット、例えば Qiagen 社の DNeasy Plant System、Amersham Biosciences 社の Nucleon PhytoPure キット等を挙げることができる。

さらに、変異 SCDH 遺伝子は、SCDH 阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌から全量 mRNA を抽出し、全量 mRNA 及び所定の配列を有する一対のプライマーを用いた RT-PCR によっても得ることができる。いもち病菌からの全量 mRNA の抽出方法としては、何ら限定されないが、例えば、グアニジウム法、SDSフェノール法、フェノール/クロロホルム抽出、若しくは市販の例えば Qiagen 社の RNeasy Total RNA System、Amersham Biosciences 社の Quick Prep Micro mRN A Purification Kit、Quick Prep Total RNA Extraction Kit 等を挙げることができる。

上述した PCR 及び RT-PCR に使用する一対のプライマーは、例えば遺伝子バンク に登録されているいもち病菌のゲノム DNA の塩基配列に基づいて、SCDH 遺伝子を 挟み込むように設計することができる。一対のプライマーは、いもち病菌のゲノ



ム DNA の塩基配列に基づいて更に機能的な配列を付加して設計することもできる。 機能的な配列とは、ベクターに連結するための制限酵素の認識配列や、フレーム を合わせるための挿入配列等を挙げることができる。

例えば、一対のプライマーとしては、以下のものを挙げるがこれに限定される ものではない。

プライマー1(配列番号5):5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3'

プライマー2(配列番号 6):5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3'

プライマー3(配列番号 7):5'-AGTTCGAACTG<u>GAATTC</u>AACCGGCACGCATGATGCATTTA-3'

プライマー4(配列番号8):5'-ATGGGTTCGCAAGTTCAAAAG-3'

プライマー5(配列番号9):5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3'

プライマー6(配列番号10):5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3'

プライマー7(配列番号11):5'-ATCGTCGACGTGAATTCGTCTTGTAAAAGCCGCCAAC-3'

なお、プライマー1、4、6 及び7はセンスプライマーであり、プライマー2、3 及び5はアンチセンスプライマーである。したがって、一対のプライマーとしては、一方をセンスプライマーから選択し、他方をアンチセンスプライマーから選択する。

プライマー2 は、公知文献 (Motoyama et al., Biosci. Biotech. Biochem, 62, 564-566, 1988) に開示された塩基配列に基づいて合成しため、アンダーラインで示した塩基が「G」となっている。しかしながら、DNA データバンクのアクセッション番号 AB004741 に記載された相当する塩基は「C」である。当該塩基は「C」が正しいが、当該塩基が「G」であっても、PCR 及び RT-PCR の結果には影響しない。プライマー3 及びプライマー7 中のアンダーラインで示した文字は Eco RI 認識配列を示している。この Eco RI 認識配列は、タンパク発現ベクター等に組み込む際利用することができる。プライマー3 及びプライマー7 において、Eco RI 認識配列より 5'側の塩基配列は、Eco RI が Eco RI 認識配列を認識するように余裕を持たせるために付加した塩基配列である。プライマー7 において、Eco RI 認識配列より 3'側の 2 個の塩基配列(すなわち、プライマー7 における 18 番目及び 1 9 番目の「GT」)は、タンパク質発現ベクター(pGEX-2T)に組み込む際のフレーム合わせ用の塩基配列である。



例えば、プライマー7 とプライマー3 を用い全量 RNA を鋳型として RT-PCR を行い、得られた PCR 生成物を Eco RI 処理後、予め Eco RI 消化とアルカリフォスファターゼでの BAP 処理を行った pGEX-2T (Amersham Biosciences 社製) に組み込んでなるプラスミドを調製することができる。このプラスミドは Rice Blast Mut ant SCDH cDNA (FERM BP-7948)として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、平成 2002年3月8日付でブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

このプラスミド (Rice Blast Mutant SCDH cDNA) は、大腸菌等の宿主内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (以下、GST と呼ぶ) との融合タンパク質として SCDH 酵素を発現することができる。なお、無細胞系のタンパク質発現システムに 適用できるように、変異 SCDH 遺伝子を有するプラスミドを構築してもよい。

さらにまた、変異 SCDH 遺伝子は、SCDH 阻害剤の存在下でもイネに対して感染するいもち病菌由来の cDNA ライブラリー及び所定のプローブを用いて得ることができる。

さらにまた、変異 SCDH 遺伝子は、野生型 SCDH 遺伝子に対して突然変異を誘発して得ることもできる。例えば、野生型 SCDH 遺伝子における 75 番目のバリン (Val) をコードするコドンを、メチオニン (Met) をコードするコドンに変異させるように設計したプライマーを用いた、いわゆる部位特異的突然変異法によって、変異 SCDH 遺伝子を得ることができる。部位特異的突然変異法を用いて変異 SCDH遺伝子を得るには、市販のキットを使用することができる。市販のキットとしては、例えば、宝酒造社の TaKaRa LA PCR in vitro Mutagenesis kit 等を挙げることができる。

ところで、上述した変異 SCDH 遺伝子は、後述する実施例で示すように、耐性いもち病菌の感染力を低下させるような新規な SCDH 阻害剤をスクリーニングする際に有効である。特に、上述した変異 SCDH 遺伝子を発現可能な状態で組み込んだ発現ベクターを用いて、当該変異 SCDH 酵素を発現させ、新規 SCDH 阻害剤としての候補物質が存在する条件下で、発現した変異 SCDH 酵素の酵素活性を測定する。当該候補物質が存在する場合に、変異 SCDH 酵素の酵素活性が低下しているか否かを判定することで新規な SCDH 阻害剤をスクリーニングすることができる。

特に、従前の判定方法では、候補物質の存在下における、いもち病菌の付着器



形成阻害を、イネそのものを使用したいわゆるポット試験やシャーレ寒天上に貼ったセロハンを付着器が破るのを観察する試験で評価しており、迅速な SCDH 阻害剤のスクリーニングを行うことが困難であった。これに対して、上述した方法によれば、簡便な方法によって SCDH 酵素の酵素活性を測定できるため、新規な SCD H 阻害剤の迅速なスクリーニングを行える。

また、上述した変異 SCDH 遺伝子の塩基配列解析から、SCDH 酵素における 75 番目のバリン (Val) がメチオニン (Met) へ変異した変異 SCDH 酵素において、SCD H 阻害剤の存在下で酵素活性を示すため、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を解析することによって、解析対象の SCDH 遺伝子が SCDH 阻害剤に対して耐性を有するか否かを調べられる。

すなわち、所定の地域等で採取されたいもち病菌(解析対象のいもち病菌)が SCDH 阻害剤に対する感受性があるか否かを検討する際、当該いもち病菌における SCDH 遺伝子(解析対象の SCDH 遺伝子)の、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸 を同定することによって、当該いもち病菌の SCDH 阻害剤に対する感受性を評価できる。

解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、如何なる方法を用いても良く、特に限定されない。SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、例えば、少なくとも SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を含む塩基配列を決み込むように設計された一対のプライマーと、鋳型 DNA(cDNA 又はゲノム DNA)を用いて、鋳型 DNA の所定の領域について塩基配列を決定する。決定した塩基配列に基づいて、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を同定することができる。

解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、解析対象のいもち病菌を固体培養した後、糸状菌糸体をとり、当該菌糸体に対してマイクロウェーブを照射することで、鋳型となるゲノム DNA を得ることが好ましい。マイクロウェーブを照射するには、例えば、電子レンジ等を使用することができる。この方法により鋳型となるゲノム DNA を得た場合には、解析対象のいもち病菌を液体培養した後に集菌し、定法に従ってゲノム DNA を抽出する方法と比較して、非常に短時間でゲノム DNA を得ることができる。



さらに、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定する際には、特に、一方のプライマーを、75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列の近傍、例えば40塩基上流にハイブリダイズするように設計することが好ましい。これにより、非常に短時間に解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を決定することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩 基配列を決定する際には、配列番号 4 で示すアミノ酸配列における 7 5 番目のバ リンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを使用 することができる。例えば、解析対象の SCDH 酵素における 7 5 番目のアミノ酸が メチオニンである場合に、当該 SCDH 酵素をコードする遺伝子にこのオリゴヌクレ オチドがハイブリダイズするように、オリゴヌクレオチドを設計する。 そして、 このオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるコロニーハイブリダイゼーションやサザンハイブリダイゼーション等の方法により、解析対象のいもち病菌にお ける SCDH 酵素の 7 5 番目のアミノ酸を同定することができる。この方法によって も、解析対象のいもち病菌における SCDH 阻害剤に対する感受性を評価することが できる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、一本鎖 DNA 高次構造多型(以下、SSCP と呼ぶ)を利用することもできる。すなわち、予め、野生型の SCDH 遺伝子と耐性 SCDH 遺伝子とにおける、一本鎖高次構造の相違に起因する泳動パターンの違いを検出しておき、解析対象の SCDH 遺伝子の一本鎖高次構造に基づく泳動パターンと比較する。これによって、解析対象の SCDH 遺伝子が、SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を同定することができる。解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際に SSCP を利用することによって、解析対象のいもち病菌の SCDH 阻害剤に対する感受性を極めて短時間に判別することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、改変した PCR-制限断片長多型(RFLP)解析法(以下、「改変 PCR-RFLP 法」と呼ぶ)を適用することもできる。すなわち、改変 PCR-RFLP 解析法によって、解析対象いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異(以下、Val75Met 変異と呼ぶ)を簡易的に検定することもできる。



改変 PCR-RFLP 解析法に際して、PCR に用いる一方のプライマーとしては、223 番目の塩基(SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸をコードするコドンに含まれる塩基)を含まず、且つ、223 番目塩基の種類によっては、3'末端側に制限酵素認識配列を有するように設計する。このとき、当該一方のプライマーは、前記制限酵素認識配列を含むように、鋳型となるゲノム DNA 或いは cDNA の塩基配列と一部ミスマッチする塩基を含んでいても良い。制限酵素認識配列としては、特に限定されないが、Xba I が認識する配列を使用することができる。

改変 PCR-RFLP 解析法では、先ず、上述したように設計した一対のプライマーと、 鋳型となるゲノム DNA 或いは cDNA を用いて PCR を行う。PCR に際しては、温度や 時間等の各種条件を適宜設定することによって、鋳型とミスマッチする塩基が含 まれているプライマーを用いても、所望の鋳型の領域を増幅することができる。P CR によって得られた産物は、223 番目の塩基によっては上記一方のプライマーと ともに制限酵素認識配列を含んでおり、また、223 番目の塩基によっては制限酵 素認識配列を含まないものとなる。

次に、PCR によって得られた産物を、上記一方のプライマーに含まれる制限酵素認識配列を認識する制限酵素で処理する。この制限酵素処理によれば、223 番目の塩基の違いによって得られる断片長が異なることとなる。次に、制限酵素処理によって得られた断片長を、例えば、電気泳動等の方法によって検出することによって、223 番目の塩基を同定することができ、解析対象の SCDH 酵素における75 番目のアミノ酸を解析することができる。

さらにまた、解析対象の SCDH 酵素における 75 番目のアミノ酸を解析する際には、一般的に知られている一塩基多型タイピング方法を適用することもできる。 一塩基多型タイピング方法としては、例えば、Applied Biosystems 社の SNaPsho t Multiplex Kit (シングルプライマー伸長反応)、Qiagen 社の Masscode system (質量分析システム)、Sequenom 社の MassARRAY システム、宝酒造社の UCAN 法、 Cleavase を用いたインベーダー法、マイクロアレイを使用した方法等が挙げられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、いもち病菌におけるメラニン生合成経路を説明する図である。



図 2 は、シタロンと 1, 3, 8-THN との UV 吸収スペクトルを示す特性図である。

図3は、遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列、標準菌株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (cDNA) 及び抵抗性株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (cDNA) を比較して示す図である。

図4は、遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列、標準菌株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (ゲノム DNA) 及び抵抗性株の SCDH 遺伝子の塩基配列 (ゲノム DNA) を比較して示す図である。

図5は、標準菌株及び抵抗性株(A及びB)それぞれから抽出した粗酵素液について、カルプロパミド濃度と SCDH 酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。図中、〇は標準菌株由来の粗酵素液を示し、△は抵抗性株A由来の粗酵素液を示し、□は抵抗性株B由来の粗酵素液を示す。

図6は、実施例4で行った一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析法の結果を示す電気泳動写真であり、A (左側) は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いた精製を行わずに電気泳動を行った場合の結果である。B (右側)は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製を行った後に電気泳動を行った場合の結果である。

図7は、プラスミド Rice Blast wild SCDH cDNA 及び Rice Blast Mutant SCDH cDNA の作製方法を概略的に示す図である。

図8は、標準菌株のcDNAを大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素、抵抗性株のcDNAを大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素、標準菌株の粗酵素液及び抵抗性株の粗酵素液とについて、カルプロパミド濃度と SCDH 酵素活性の阻害率との関係を示す特性図である。図中、〇は標準菌株由来の粗酵素液を示し、△は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素を示し、●は抵抗性株由来の粗酵素液を示し、▲は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素を示している。

図 9 は、標準菌株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素及び抵抗性株の cDNA を大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素について、フェノキサニル及びジクロシメットの濃度と阻害率との関係を示す特性図である。図中、〇は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキサニルによる阻害を示し、 $\Delta$ は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するフェノキ



サニルによる阻害を示し、●は標準菌株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害を示し、△は抵抗性株 cDNA から発現した GST 融合 SCDH 酵素に対するジクロシメットによる阻害を示している。

図10は、実施例6で行った PCR-RFLP 法を応用して SCDH 酵素における、Val75Met 変異を解析した結果を示す電気泳動写真(3%アガロースゲル)である。

## 発明を実施するための最良の形態

#### [実施例]

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。しかしながら、本発明の技術的範囲は、これら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

本例では、先ず、SCDH 酵素を抽出する際に用いる糸状菌糸体を調製した。標準 (野性) 菌株のイネいもち病菌 (Pyricularia oryzae) 及びカルプロパミド耐性を示すイネいもち病菌 (抵抗性株 (A 及び B)) の胞子溶液  $(10^5/m1)$  を、それぞれ yeast 抽出物 (5g)、グルコース (20g)、  $KH_2PO_4(0.5g)$ 、  $Na_2HPO_4(0.5g)$  及び  $CaCl_2(0.5mg)$  を含む YGPCa 液体培養液 (pH6.5) 200ml に接種し、27℃で 4~5 日培養した。

培養後、培養液を遠心分離にかけて糸状菌糸を収集後、蒸留水で洗浄し、菌糸 重量の 5 倍量の冷アセトンを加え、Waring blender でホモジナイズした。ホモジ ネートを遠心し(15,000 x g、20分)、沈降物を 4℃で乾燥してアセトンパウダー を得た。このアセトンパウダーを-85℃で保存した。

得られたアセトンパウダーを用いて、SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製し、当該 SCDH 酵素の酵素活性を測定した。SCDH 酵素を含む粗酵素液を調製する際には、アセトンパウダーを 20m1 の 1/15M リン酸カリウムバッファー (pH6.8) に懸濁し、氷冷下、30 分撹拌した後、15,000 x g で 15 分間遠心分離した。遠心分離により得られた上澄みを粗酵素液とした。

次に、粗酵素液を用いて SCDH 酵素の酵素活性を測定する際には、先ず、1mM EDTA 含有 100mM リン酸バッファー(pH6.8) 1,300  $\mu$  1,20mM シタロン(エタノール溶液) 30  $\mu$  1、適当な濃度のカルプロパミドのエタノール溶液 30  $\mu$  1 および超純水 1,440



 $\mu 1$  を混合し、27℃で 2 分間プレインキュベートした。次に、粗酵素液 200 $\mu 1$  を添加して酵素反応を開始した。酵素反応によりシタロンから生成された 1,3,8-THN 量を UV350nm での吸光度上昇として、100 秒間モニタリングすることに より粗酵素液に含まれる SCDH 酵素に起因する酵素活性を測定した。なお、基質のシタロンはカルプロパミド存在下で標準(野性)菌を液体培養し、得られた菌糸体から常法(Kurahashi wt al., J. Pestic. Sci, 23, 22-28, 1998)により調製した。

結果を図5に示す。この結果を用いて50%阻害濃度( $I_{50}$ 値)をプロビット解析により算出した。その結果、標準(野性)菌から抽出された粗酵素液ではカルプロパミドに対する $I_{50}$ 値が7.45nMであったのに対し、抵抗性菌株 A 及び B ではそれぞれ163nM 及び157nMであった。これらの値から、R/S 比はおおよそ21.5 であった。このことは、抵抗性菌株 A 及び B におけるカルプロパミド耐性の要因が、カルプロパミドのターゲットであるシタロン脱水酵素の感受性が低下したことによることを示唆した。

#### 実施例2

本例では、先ず、いもち病菌からゲノム DNA 及び mRNA を抽出するため、以下のように糸状菌糸体を調製した。先ず、標準(野性)菌及びカルプロパミド耐性を示すいもち病菌(抵抗性株(A 及び B))をオートミール培地上でそれぞれ培養した。培養後、菌糸体部分を 20ml の potato-dextrose (PD) 液体培地に接種し、28℃で3日間、前培養した。前培養によって生長した糸状菌糸が団子状となるため、これを滅菌した Waring blender でホモジナイズし、その内 1ml ずつを 20ml の PD 液体培地中で更に 3~5日間培養した。菌糸体を減圧濾過により濾別後、蒸留水で洗浄した。これらの菌子体を液体窒素下、乳鉢ですりつぶし、微粉末とし、-85℃で保存した。これにより、標準(野性)菌由来の微粉末、抵抗性株 A 由来の微粉末及び抵抗性株 B 由来の微粉末が得られた。

抵抗性株A由来の微粉末を用いて全量RNAを抽出する際には、Rneasy Plant Mini Kit(Qiagen 社製)を用い、添付のプロトコルに従った。得られた微粉末を用いてゲノム DNA を抽出する際には、Dneasy Plant Mini Kit(Qiagen 社製)を用い、添

付のプロトコルに従った。RNA 濃度は分光光度計で OD<sub>260</sub> での吸光度を測定することにより定量した。DNA 濃度は 1% アガロースゲル上での明度の様子か、Hoe 33258 (ヘキスト社製) を用いた蛍光スペクトルの測定によった。

次に、得られた全量 RNA を用いて抵抗性株の変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA を調製した。変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA を調製する際には、先ず、得られた RNA(2 $\mu$ g)を、最終容量が  $50\mu$ 1 となるように、 $2\mu$ 1 の oligo (dT) $_{20}$ (10pmol/ $\mu$ 1)、各々  $2\mu$ 1 のプライマー1(5'-GCAGTGATACCCACACCAAAG-3', 25pmol/ $\mu$ 1)及びプライマー 2(5'-TTATTTGTCGGCAAAGGTCTCC-3', 25pmol/ $\mu$ 1)並びに RT-PCR bead (Amersham Biosciences 社製)と混合し反応溶液を調製した。反応は以下の条件に従って行った。 cDNA の合成として 42 $^{\circ}$ 0 の分、続いて 95 $^{\circ}$ 0 の分反応した。続いて、合成した cDNA を鋳型とする PCR 反応として 95 $^{\circ}$ 0 の秒、55 $^{\circ}$ 0 分及び 72 $^{\circ}$ 0 分からなるステップを 35 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72 $^{\circ}$ 0 つがりなるステップを 35 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、42 $^{\circ}$ 0 の反応後の反応溶液を、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製)を用いて精製することによって RT-PCR 生成物を得た。なお、標準菌株の SCDH 遺伝子を含む cDNA 及び抵抗性株 B の SCDH 遺伝子を含む cDNA も上述した方法と同様にして、得ることができた。



次に、得られた RT-PCR 産物及び PCR 産物を用いて、変異 SCDH 遺伝子を含む cDNA 及び変異 SCDH 遺伝子を含む DNA の塩基配列を決定した。塩基配列の決定に際しては、Applied Biosystems 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いた。

このキットを用いたシークエンス反応は、鋳型の RT-PCR 或いは PCR 産物、  $3.2pmol\ or \mathcal{P}$  のプライマー(プライマー1, プライマー3, プライマー5 及びプライマー6) 及び $8\mu 1$  の  $terminator\ pre-mix$  を混合して総量 $20\mu 1$  の反応溶液中で行った。 反応条件としては、96 で 10 秒、50 で 5 秒及び 60 で 4 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、60 で 7 分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等の成分を Auto Seq G-50 (Amersham Bioscience 社製)を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物を Applied Biosystems 社の ABI 310 Genetic Analyzer で解析して塩基配列決定した。RT-PCR 産物を鋳型として決定した変異 SCDH 遺伝子の塩基配列を配列番号 1 に示し、変異 SCDH 遺伝子によりコードされる変異 SCDH 酵素のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

RT-PCR 産物を鋳型として変異 SCDH 遺伝子の cDNA について解析した結果を図3に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列(登録番号 AB004741、上段)と、標準菌株から得られた RT-PCR 産物を用いて解析された SCDH 遺伝子の塩基配列(中段)と、抵抗性株 A から得られた RT-PCR 産物を用いて解析された変異 SCDH 遺伝子の塩基配列(下段)とを比較した図である。

また、PCR 産物を鋳型として、ゲノム DNA に存在する変異 SCDH 遺伝子について解析した結果を図4に示した。図3は遺伝子バンクに登録されているいもち病菌の SCDH 遺伝子の塩基配列(登録番号 AB004741、上段)と、標準菌株から得られた PCR 産物を用いて解析された SCDH 遺伝子の塩基配列(中段)と、抵抗性株 A から得られた PCR 産物を用いて解析された変異 SCDH 遺伝子の塩基配列(下段)とを比較した図である。

これら図3及び図4から、抵抗性株 A においては、SCDH 遺伝子の cDNA 塩基配列における223番目のG(グアノシン)がA(アデノシン)にホモに変異していること



が判った。これは、標準菌株の SCDH 酵素のアミノ酸配列における 75 番目のバリン(Val)がメチオニン(Met)へ変異することを意味していた。また cDNA 塩基配列における 450 番目の塩基が登録されている塩基配列(登録番号 AB004741、図 3 において上段)では T(チミジン)であったが、標準菌株及び抵抗性株では C(シチジン)であった。但しこの cDNA 塩基配列における 450 番目の塩基の変異は、アミノ酸変異を伴っていないので、SCDH 阻害剤に対する感受性には何ら関与していないと考えられる。

また、図4から、配列番号3に示した塩基配列における42番目と43番目の間及び141番目と142番目の間に、それぞれ81塩基と約89塩基のイントロンを確認した。後者はポリA鎖が連なっていたため、PCRを行った際、長さの異なるものが生成してきてしまい明確な長さは確認できなかったため、約89塩基となっている。

#### 実施例3

いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン(Val)からメチオニン(Met) への変異(以下、Val75Met 変異と呼ぶ)の簡易検定法を検討した。

オートミール培地 (5%オートミール、2%シュークロース及び 1.5%寒天) 上、28℃ で生育させたイネいもち菌の菌体を爪楊枝で取り、1.5 μ 1 のマイクロチューブに移した。蓋をして、電子レンジ(600W)で 5~7 分、マイクロウェーブを照射した。この処理によって、菌体の細胞壁を破壊した。



Kit(Invitek 社製)を用いて精製し、PCR 産物を得た。反応溶液に含まれる PCR 産物は、Applied Biosystems 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を用いてシークエンス反応を行った。

シークエンス反応に際しては、鋳型となる PCR 産物、3.2pmo1 のプライマー6(5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3')及び  $8\mu1$  の terminator pre-mix を混合し、総量 $20\mu1$  の反応溶液を調製した。シークエンス反応としては、96℃で 10 秒、50℃で5 秒及び 60℃で 4分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、60℃で 7 分間反応を完結させた。反応終了後、反応溶液に残存するダイターミネータ等を Auto Seq G-50 (Amersham Biosciences 社製)を用いたゲル濾過により除去した。その後、反応生成物を同社の ABI 310 Genetic Analyzer でシークエンス解析した。この際、Amersham Biosciences 社製の 47cm  $\times 50\mu$ m のショートキャピラリーカラムを用いることにより、1 サンプル当たり約 35 分という短時間で 75 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンに変異していることを判定できた。

#### <u> 実施例 4</u>

一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析法を適用した、いもち病菌の SCDH 酵素における、75 番目のバリン(Val)からメチオニン(Met)への変異(以下、Val75Met 変異と呼ぶ)の簡易検定法を検討した。

実施例 3 と同様に、いもち病菌糸状菌糸体をマイクロウェーブ照射してゲノム DNA 溶液を簡易に調製した。このゲノム DNA 溶液  $5\mu$ 1 を、最終容量が  $25\mu$ 1 となるように、各々 $1\mu$ 1 のプライマー6(5'-ACAAGCTCTGGGAGGCAATG-3',  $25pmo1/\mu$ 1)、プライマー5(5'-GTGGCCCTTCATGGTGACCTCCT-3',  $25pmo1/\mu$ 1)及び PCR bead (Amersham Biosciences 社製) と混合して反応溶液を調製した。PCR 反応としては、95 で 30 秒、55 で 1 分及び 72 で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72 で 7 分間反応を完結させた。この反応の結果、215bp の PCR 生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製)を用いて、反応溶液に残存する taq DNA polymerase やプライマー等を除去した。

その後、SSCP のための loading buffer として、0.5M EDTA(pH8.0)0.4ml、ブロ

モフェノールブルー10mg 及びホルムアミド 10ml を混合したものを調製した。反 応溶液と loading buffer とを 1:1 で混合し、85℃で 15 分加熱した後、一気に氷 冷した。これにより、反応溶液に含まれる PCR 産物を一本鎖 DNA とした。

次に、反応溶液及び loading buffer の混合液を用いて、Amersham Biosciences 社の PhastSystem 全自動電気泳動システムで電気泳動を行った。ゲル担体及びバ ッファー試薬として、同社の PhastGel Homogeneous 12.5 と PhastGel Native Buffer Strips を用い、400V、10mA、2.5W、4℃、100Vhで前泳動した後、400V、 10mA、2.5W、4℃、200Vh 本泳動した。その結果を図 6 A及びBに示した。なお、 図 6 Aは、上述した GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitを用いた精製 を行わずに上記電気泳動を行った場合の結果である。図 6 Bは、上述した GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製を行った後に上記電気泳動を 行った場合の結果である。

図6A及びBそれぞれの一本鎖 DNA の泳動パターンが異なるが、これは PCR 溶液中のバッファー組成によるものと考えられる。いずれにしろ、図6A及びBから標準菌株とカルプロパミド耐性菌株では泳動パターンに違いが見られ、それぞれを識別することが可能であった。

#### <u>実施例 5</u>

変異 SCDH 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築し、SCDH 阻害剤に対する抵抗性を検討した。

RT-PCR を行う際には、先ず、標準 (野性) 菌或いはカルプロパミド耐性いもち菌から抽出した全量 RNA (各々 $2\mu$ g) を、 $2\mu$ 1 の oligo (dT)  $_{20}$  (10pmol/ $\mu$ 1) と、各々

 $2\mu1$  のプライマー4(25pmol/ $\mu1$ )及びプライマー3(25pmol/ $\mu1$ )と、RT-PCR bead (Amersham Biosciences 社製)とを混合し、最終容量  $50\mu1$  の反応溶液を調製した。 反応は以下の条件によって行った。 反応溶液を  $42^{\circ}$ で 30 分、続いて  $95^{\circ}$ で 30 分反応して cDNA 鎖を合成した。その後、引き続いて  $95^{\circ}$ で 30 秒、 $55^{\circ}$ で 1 分及 び  $72^{\circ}$ で 1 分からなるステップを 25 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。 反応終了後、反応溶液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製)を用いて RT-PCR 生成物を精製し、その後、最終  $50\mu1$  の滅菌水で溶出した。

次に、RT-PCR 生成物を含む溶液のうち 30 μ 1 を、10 x H 緩衝液 (Takara 社製) 4 μ 1、Eco RI 1μ1(12u/μ1、Takara 社製) と混合して最終容量 40 μ 1 とし、37℃ で 2 時間制限酵素反応に供した。制限酵素反応後、反応溶液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製) で精製し、30 μ 1 の滅菌水で溶出した。

一方、GST 融合タンパク発現ベクターである pGEX-2T (Amersham Biosciences 社製)  $1\mu$ g を 10 x H 緩衝液 (Takara 社製)  $1\mu$ 1 及び Eco RI  $1\mu$ 1 ( $12u/\mu$ 1、 Takara 社製) と混合して最終容量  $10\mu$ 1 とし、37<sup> $\circ$ </sup>Cで 1 時間制限酵素反応に供した。この反応液に BAP 緩衝液  $10\mu$ 1 (TOYOBO 社製)、アルカリフォスファターゼ  $2.5\mu$ 1 ( $0.4u/\mu$ 1, BAP-101, TOYOBO 社製)及び滅菌水  $77.5\mu$ 1 を加え、37<sup> $\circ$ </sup>Cで 2 時間脱リン酸化反応に供した。

次に、 $2\mu1$ の Eco RI 消化された RT-PCR 生成物、 $1\mu1$ の Eco RI/BAP 処理された pGEX-2T、 $2\mu1$ の滅菌水及び $5\mu1$ のライゲーション緩衝液 I 液 (Ver. 2, Takara 社製)と混合して反応液を調製し、16℃で 12 時間ライゲーション反応に供した。反応終了後、大腸菌 (JM109 株)のコンピテントセル (Takara 社製) に添付されているプロトコルに従い、反応液を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換した。次に、形質転換された大腸菌 JM109 株を、アンピシリン 50ppm を含む LB 固体培地上に広げ、37℃で 12 時間静置培養した。培養後、数点のシングルコロニーを掻き取り、ダイレクトコロニーPCR を行った。そして、ダイレクトコロニーPCR の結果、目的の方向に SCDH 遺伝子が挿入された pGEX-2T をスクリーニングし、更に、塩基配列を決定することによって、挿入された SCDH 遺伝子の塩基配列に間違いがないかを確認



した。以上の方法の概略を図7に示した。また、以上の方法で得られたプラスミドは Rice Blast Mutant SCDH cDNA (FERM BP-7948)として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成2002年3月8日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託した。

次に、SCDH 遺伝子が正しく挿入された pGEX-2T ベクターで形質転換された大腸菌を、50ppm アンピシリンを含む LB 液体培地 200ml で  $0D_{260}$ が 0.6~1.0 になるまで 27℃で培養した。その後、イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド (IPTG) を最終濃度 1mM になるように添加し、更に 27℃で 5 時間激しく撹拌培養した。培養後、遠心(10,000 x g, 10 分,4℃)により大腸菌を集菌した。大腸菌を洗浄するため、冷却した 1/15M リン酸カリウム緩衝液(pH6.8) 10ml に一度懸濁させた後、再度遠心(10,000 x g, 10 分,4℃)により大腸菌を集菌した。その後、再度、冷却した 1/15M リン酸カリウム緩衝液(pH6.8) 5ml に懸濁し、氷冷しながらマイクロチップで超音波処理した後、4℃、15,000 x g で 20 分遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

この粗酵素溶液を用いて、カルプロパミドに対する感受性を測定した。カルプロパミドに対する感受性は、上述した実施例1と同様にして測定した。その結果を図8に示した。なお図8において、白抜きの円を結んだグラフ及び塗りつぶしの円を結んだグラフは、実施例1において測定したカルプロパミドに対する感受性の測定結果である。

図8から、大腸菌中で発現させた GST 融合 SCDH 酵素は、標準菌とカルプロパミド耐性菌の両方ともに、いもち病菌から抽出した粗酵素液に含まれる SCDH 酵素と同じ薬剤感受性を示した。

さらに、SCDH 阻害剤としてフェノキサニル及びジクロシメットについても同様に感受性を検討した。結果を図9に示す。

図9より、GST 融合 SCDH 酵素は、これらフェノキサニル及びジクロシメットに対しても耐性を示すことが判った。すなわち、これら図8及び図9に示した結果から、GST 融合 SCDH 酵素は、様々な SCDH 阻害剤の存在下において高い酵素活性を示すことが明らかとなった。したがって、SCDH 阻害剤の存在下においてもイネに対して高い感染力を示す耐性いもち病菌を防除する薬剤を発見・開発する際に、



GST 融合 SCDH 酵素を用いて候補物質のスクリーニングを行うことができる。詳細には、候補物質の存在下において、GST 融合 SCDH 酵素の酵素活性を測定し、当該酵素活性を有意に低下させた候補物質を選択する。選択された候補物質は、変異SCDH 酵素の酵素活性を低下させ、耐性いもち病菌の感染力を低下させる。これによって、耐性いもち病菌に起因するいもち病の発生を防止できる

#### 実施例 6

いもち病菌の SCDH 酵素における、Val75Met 変異の簡易検定法について、PCR—RFLP 法を応用して検討した。実施例 3 と同様に、いもち病菌糸状菌糸をマイクロウェーブ照射してゲノム DNA 溶液を簡易に調製した。このゲノム DNA 溶液  $5\mu$ 1 を、最終容量が  $25\mu$ 1 となるように、各々 $1\mu$ 1 のプライマー8(配列番号 1 2、5 '-TTCGTCGGCATGGTCTCGAGCATCTAG-3',  $25pmo1/\mu$ 1)、プライマー5(5'-GTGGCCCTTC ATGGTGACCTCCT-3',  $25pmo1/\mu$ 1)及び PCR bead (Amersham Bioscience 社製)と混合して反応溶液を調製した。

プライマー8中の下線を付した塩基「TCT」は、鋳型となるゲノム DNA の塩基配列とはミスマッチであり、3'側に隣接する塩基「AG」と後述の PCR により増幅される最初の塩基とともに、制限酵素 Xba I の切断認識部位(「TCTAGA」)となりうるために設計された配列である。すなわち、PCR により増幅される最初の塩基が Aである場合には、プライマー8 により増幅される断片には、制限酵素 Xba I の切断認識部位が含まれることとなる。一方、PCR により増幅される最初の塩基が A以外である場合には、増幅断片に制限酵素 Xba I の切断認識部位が存在しないこととなる。

PCR 反応としては、95℃で 30 秒、55℃で 1 分及び 72℃で 2 分からなるステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃で 7 分間反応を完結させた。この反応の結果、183bp の PCR 生成物を得た。GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences 社製)を用いて、PCR 生成物を精製し、その後、最終  $20\mu1$  の滅菌水で溶出した。この内、 $7.5\mu1$  を、 $10 \times M$  緩衝液 (Takara 社製)  $1\mu1$ 、0. 1%BSA 溶液  $1\mu1$ 、Xba I  $0.5\mu1$ ( $12u/\mu1$ 、Takara 社製)と混合して最終容量  $10\mu1$  とし、37℃で 1 時間制限酵素反応に供した。反応液全量を 3%アガロースに泳



動した結果を図10に示した。なお、図10において、レーン2は標準菌株から抽出したゲノム DNA を用いた反応液であり、レーン3は抵抗性菌株から抽出したゲノム DNA を用いた反応液であり、レーン4は標準菌株から抽出したゲノム DNA を用い制限酵素反応を行わなかった反応液であり、レーン5は抵抗性菌株から抽出したゲノム DNA を用い制限酵素反応を行わなかった反応液である。

図10より明らかなように、抵抗性株由来のPCR生成物のXba I 処理サンプルでは25塩基程短い断片となっていた。この結果から、標準菌株(野性株)と抵抗性菌株の区別がPCR-RFLP法を応用して可能であることが明らかとなった。

#### 産業上の利用の可能性

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、SCDH 阻害剤に対する耐性いもち病菌に関する研究等に広範囲に使用することができる遺伝子を提供することができる。また、この遺伝子は、新規な SCDH 阻害剤のスクリーニングや、解析対象のいもち病菌における SCDH 阻害剤に対する感受性の評価等に使用することができる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号5~12は、合成プライマーである。



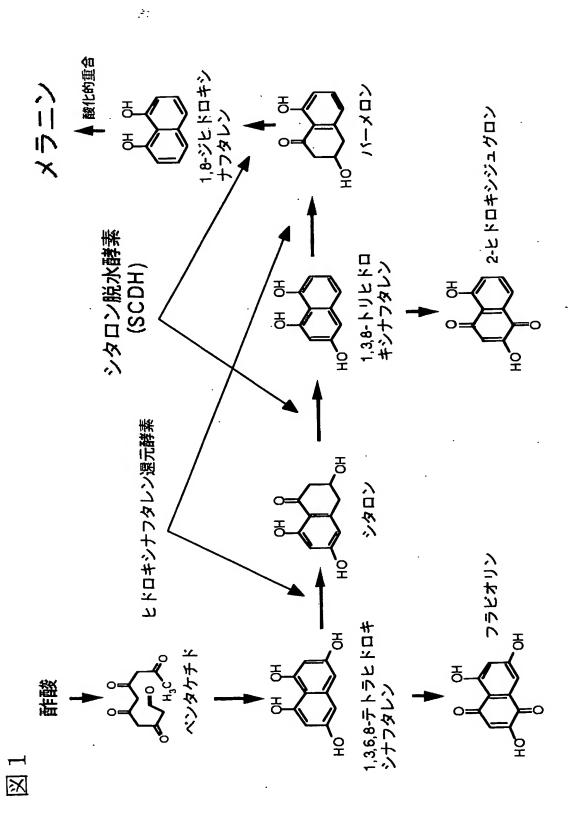
#### 請求の範囲

- (1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。
- (a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号2に示すアミノ酸配列における1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、シタロン脱水酵素阻害剤の存在下でシタロン脱水酵素活性を示すタンパク質。
- (2) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、メラニン生合成経路におけるシタロンから 1,3,8-トリヒドロキシナフタレンへの脱水反応を阻害することを特徴とする請求の範囲 1 記載の遺伝子。
- (3) 上記シタロン脱水酵素阻害剤は、カルプロパミドであることを特徴とする請求の範囲1記載の遺伝子。
  - (4) 請求の範囲1記載の遺伝子によりコードされるシタロン脱水酵素。
  - (5) 請求の範囲1記載の遺伝子を含む組換えベクター。
  - (6) 請求の範囲5記載の組換えベクターを形質転換してなる形質転換体。
- (7) 以下の工程を有するいもち病菌のシタロン脱水酵素阻害剤に対する感 受性評価方法。
- (a)評価対象のいもち病菌におけるシタロン脱水酵素のアミノ酸配列における、 配列番号4に示すアミノ酸配列の75番目のバリンに相当するアミノ酸を同定す る工程。
- (b)上記(a)工程の結果に基づいて、評価対象のいもち病菌のシタロン脱水 酵素阻害剤に対する感受性を評価する工程。
- (8) 上記(b)工程では、上記(a)工程で同定した上記アミノ酸がメチオニンである場合に、野生型のいもち病菌と比較して、評価対象のいもち病菌がシタロン脱水酵素阻害剤に対して低い感受性を示すと評価することを特徴とする請求の範囲7記載の感受性評価方法。
- (9) 請求の範囲4記載のシタロン脱水酵素を含む、阻害剤スクリーニングキット。
- (10) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を挟むように設計した一対のプライマーを備え

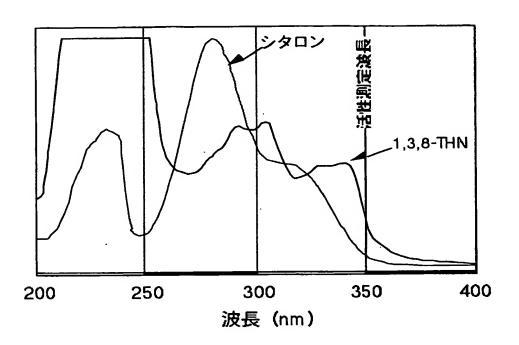


る、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。

(11) 配列番号4で示すアミノ酸配列における75番目のバリンに相当するアミノ酸をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを備える、シタロン脱水酵素阻害剤抵抗性いもち病菌評価キット。



**:**::





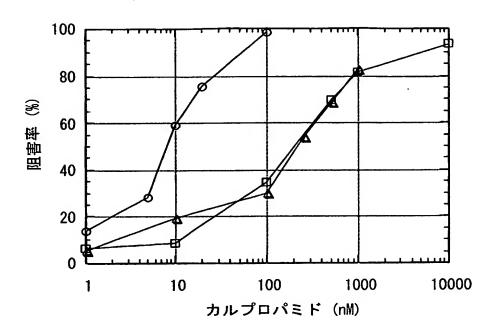
Ŕ.

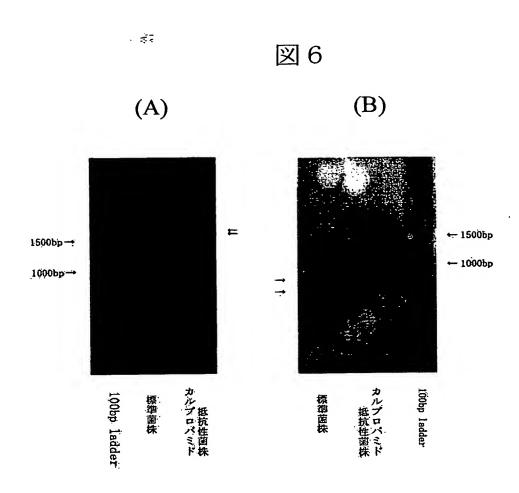
P. oryzae 景準菌株 抵抗性株		-37	CTAGCAACCGCAGTGATACCCACACCAAAGAGCTTCCTTC	-21 -21 -21
P. oryzae	NR004741 .	-20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
_	ADOUGIT	20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
泵準菌 <b>株</b>	•	20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
<b>抵抗性株</b>	•	-20	######################################	
P. oryzae	AB004741	41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100
景準菌株		41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100
抵抗性株		41	CAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGGCAGACAGCTACGACTCCAAGG	100
P. oryzae	AB004741 :	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160
原準菌株		101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160
<b>低抗性株</b>	:	101	ACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGCGCATTGACTACCGCTCCTTCC	160
P. oryzae	AB004741	161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
標準菌株		161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
抵抗性株	:	161	TCGACAAGCTCTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGC	220
P. oryzae	AB004741	221	AGGTGCTGGGCGACCCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCGCTGGGAGA	280
標準菌株		221	AGGTGCTGGGCGACCCCACCCTCCGCACGCACTTCATCGGCGCACGCGCTGGGAGA	280
抵抗性株	:	221	AGATGCTGGGCGACCCCACCCTCCGCACGCACCACTTCATCGGCGCACGCGCTGGGAGA **.******************************	280
P. oryzae	AB004741	281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340
標準菌株		281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340
抵抗性株		281	AGGTGTCCGAGGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACA	340
P. oryzae	AB004741	341	AGGACACCACCATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400
提。OLYZGE 標準菌株	Minorian	341	AGGACACCACCATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400
抵抗性株		341	AGGACACCATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACT	400
P. oryzae	AB004741	401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCGATATCCGCTGGG	460
標準菌株		401	CGTACAAGAAGATCGACGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGG	460
抵抗性株		401	GGTACAAGAAGATCGACGGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGG	460
P. oryzae	AB004741	461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGAGACCTTTGGCGACAAATAAA	520
標準菌株		461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG	508
抵抗性株		461	GCGAGTTCGACTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGGAGACCTTTG	508



原华菌株 抵抗性株		AB004741	-46	CTAGCAACCGCAGTGATACCCACACCAAAGAGCTTCCTTC	-21 -21 -21
			**************		
P. ory	zae	AB004741	-20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
摩準菌株			-20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40
抵抗性株		-20	AACTTGTAAAAGCCGCCAACATGGGTTCGCAAGTTCAAAAGAGCGATGAGATAACCTTCT	40	
P. ory	zae	AB004741	41	CA	42
標準菌株				CAGGTGAGCATAATATCCCCCCTCCAAAAAGAAAATAGCGGTGAAGCCACCAACGACAGTA	100
抵抗性株			41	CAGGTGAGCATAATATCCCCCTCCAAAAAGAAAATAGCGGTGAAGCCACCAACGACAGTA **	100
-		AB004741	43	GACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	79 160
<b>標準菌株</b>			101	COGCTGACCCTAATTCCCCTCCAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	160
抵抗性株			101	CCGCTGACCCTAATTCCCCTCCAGACTACCTGGGCCTCATGACTTGCGTCTATGAGTGGG	100
P. ory	zae	AB004741	80	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	139
標準菌株			161	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	220 220
抵抗性株			161	CAGACAGCTACGACTCCAAGGACTGGGATAGGCTGCGAAAAGGTCATTGCGCCTACTCTGC	220
_		AB004741	140	GC	141 280
標準菌株			221	GCGTATGTTCCGCCCTGCCATGTTTATTTTTACTTTCCCACACCAAATCCAGACTTTAAC GCGTATGTTCCGCCCTGCCATGTTTATTTTTTACTTTCCCACACCAAATCCAGACTTTAAC	280
抵抗性株		221	**	200	
		AB004741	142	ATTGACTACCGCTCCTTCCTCGACAAGCT	170
標準菌株			281	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGATTGACTACCGCTCCTTCCT	340 336
抵抗性株		328	AGCGACGACCAAAAAAAAAAAAAACAGATTGACTACCGCTCCTTCCTCGACAAGCT	336	
P. ory	zae	AB004741	171	CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCA	230
標準菌株	ŧ			CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGGTCTCGAGCAAGCA	400
抵抗性样	ŧ		337	CTGGGAGGCAATGCCGGCCGAGGAGTTCGTCGGCATGCTCTCGAGCAAGCA	396
		AB004741	231	CGACCCCACCCTCCGCACGCAGCACTTCATCGGCGGCACGCCTGGGAGAAGGTGTCCCGA	290 460
標準菌材			401	CGACCCACCTCCCCACCCACCACTTCATCCCCACCACCACCA	456
抵抗性特	Ř		397	**************************************	
P. ory	zae	AB004741	291	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	350
標準菌材			461	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	520
抵抗性符	k		457	GGACGAGGTCATCGGCTACCACCAGCTGCGCGTCCCGCACCAGAGGTACAAGGACACCAC	516
P. ory	zae	AB004741	351	CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	410
標準菌材	ŧ			CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACGCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	580
抵抗性株		517	CATGAAGGAGGTCACCATGAAGGGCCACCCCACTCGGCAAACCTTCACTGGTACAAGAA	576	
P. oryzae	AB004741	411	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCCGATATCCGCTGGGCGAGTTCGA	470	
標準菌材			581	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGGGCGAGTTCGA	640 636
抵抗性株		577	GATCGACGGCGTCTGGAAGTTCGCCGGCCTCAAGCCCGACATCCGCTGGGGCGAGTTCGA	ەدە	
P. oryzae	AB004741	471	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGAGACCTTTGGCGACAAATAAAT	530	
標準菌材			641	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGAGACCTTTGGCGACAAA	700
抵抗性树	ķ		637	CTTTGACAGGATCTTTGAGGACGGACGGAGACCTTTGGCGACAAA	696

š.

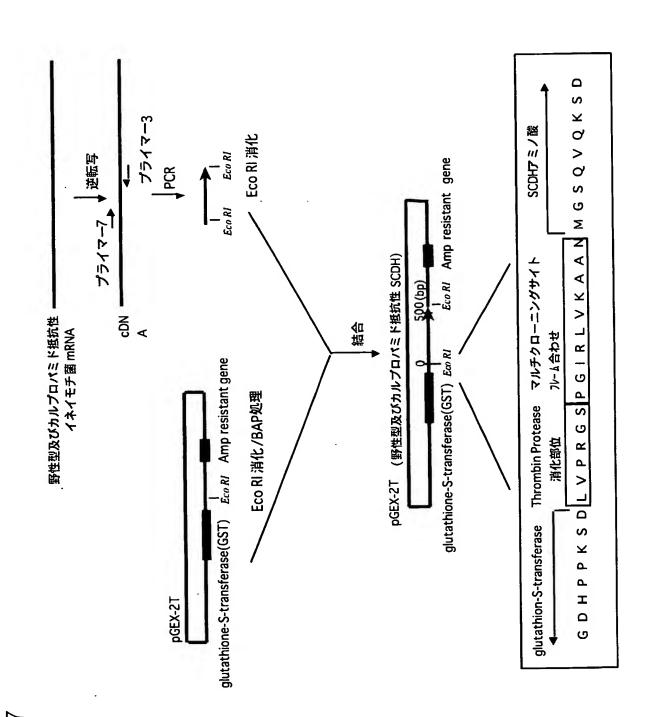




6/10

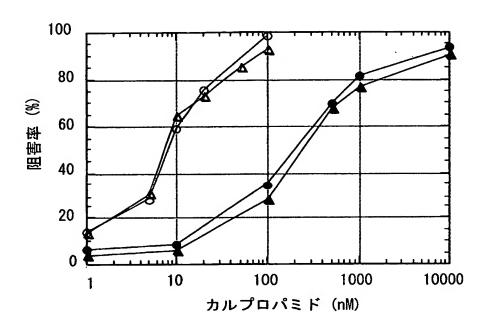
# BEST AVAILABLE COPY

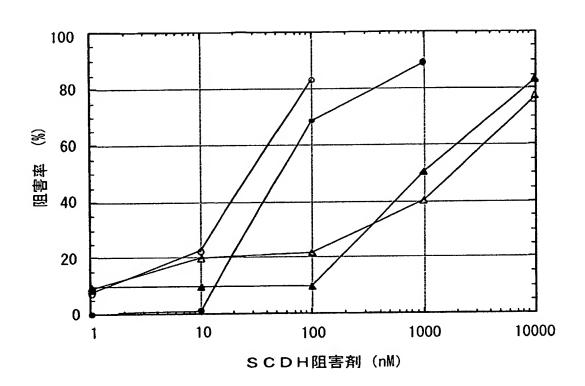
ż.





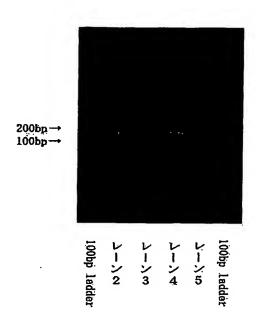
À.





: ₹ ₹

図10



BEST AVAILABLE COPY



## SEQUENCE LISTING

<110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

<120> A gene coding for scytalone dehydratase having conferring resistance to an agricultural fungicidal agent

<130> PH-1735-PCT

<150> JP 2002-66955

<151> 2002-03-12

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 516

<212> DNA

<213> Pyricularia oryzae

⟨220⟩

<221> CDS

<222> (1).. (516)

<400> 1

atg ggt tcg caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac 48
Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1 5 10 15

ctg	ggc	ctc	atg	act	tgc	gtc	tat	gag	tgg	gca	gac	agc	tac	gac	tcc	96
Leu	Gly	Leu	Met	Thr	Cys	Val	Tyr	Glu	Trp	Ala	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ser	
			20					25					30			
aag	gac	tgg	gat	agg	ctg	cga	aag	gtc	att	gcg	cct	act	ctg	cgc	att	144
Lys	Asp	Trp	Asp	Arg	Leu	Arg	Lys	Val	Ile	Ala	Pro	Thr	Leu	Arg	Ile	
		35					40					45				
gac	tac	cgc	tcc	ttc	ctc	gac	aag	ctc	tgg	gag	gca	atg	ccg	gcc	gag	192
Asp	Tyr	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Trp	Glu	Ala	Met	Pro	Ala	Glu	
	50					55					60					
gag	ttc	gtc	ggc	atg	gtc	tcg	agc	aag	cag	atg	ctg	ggc	gac	ccc	acc	240
Glu	Phe	Val	Gly	Met	Val	Ser	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Gly	Asp	Pro	Thr	
65					70					75					80	
ctc	cgc	acg	cag	cac	ttc	atc	ggc	ggc	acg	cgc	tgg	gag	aag	gtg	tcc	288
Leu	Arg	Thr	Gln	His	Phe	Ile	Gly	Gly	Thr	Arg	Trp	Glu	Lys	Val	Ser	
				85					90					95		
gag	gac	gag	gtc	atc	ggc	tac	cac	cag	ctg	cgc	gtc	ccg	cac	cag	agg	336
Glu	Asp	Glu	Val	Ile	Gly	Tyr	His	Gln	Leu	Arg	Val	Pro	His	Gln	Arg	
			100					105					110			
tac	aag	gac	acc	acc	atg	aag	gag	gtc	acc	atg	aag	ggc	cac	gcc	cac	384
Tyr	Lys	Asp	Thr	Thr	Met	Lys	Glu	Val	Thr	Met	Lys	Gly	His	Ala	His	
		115					120					125				



tcg gca aac ctt cac tgg tac aag aag atc gac ggc gtc tgg aag ttc 432 Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe 130 135 140

gcc ggc ctc aag ccc gat atc cgc tgg ggc gag ttc gac ttt gac agg 480
Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg
145 150 155 160

atc ttt gag gac gga cgg gag acc ttt ggc gac aaa 516

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys

165 170

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Pyricularia oryzae

<400> 2

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1 5 10 15

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser
20 25 30

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile 35 40 45

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu 3/11

50

55

60

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Met Leu Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser 85 90 95

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg 100 105 110

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His
115 120 125

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe 130 135 140

Ala Gly Leu Lys Pro Asp Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg

145 150 155 160

Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys
165 170

<210> 3

<211> 516

<212> DNA

<213> Pyricularia oryzae

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (516)

<400> 3

atg ggt tcg caa gtt caa aag agc gat gag ata acc ttc tca gac tac 48

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr

1 5 10 15

ctg ggc ctc atg act tgc gtc tat gag tgg gca gac agc tac gac tcc 96

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser

20 25 30

aag gac tgg gat agg ctg cga aag gtc att gcg cct act ctg cgc att 144
Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile
35 40 45

gac tac cgc tcc ttc ctc gac aag ctc tgg gag gca atg ccg gcc gag 192
Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu
50 55 60

gag ttc gtc ggc atg gtc tcg agc aag cag gtg ctg ggc gac ccc acc 240
Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

ctc cgc acg cag cac ttc atc ggc ggc acg cgc tgg gag aag gtg tcc 288 Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser

85 90 95



gag	gac	gag	gtc	atc	ggc	tac	cac	cag	ctg	cgc	gtc	ccg	cac	cag	agg	336
Glu	Asp	Glu	Val	Ile	Gly	Tyr	His	Gln	Leu	Arg	Val	Pro	His	Gln	Arg	
			100					105					110			
tac	aag	gac	acc	acc	atg	aag	gag	gtc	acc	atg	aag	ggc	cac	gcc	cac	384
Tyr	Lys	Asp	Thr	Thr	Met	Lys	Glu	Val	Thr	Met	Lys	Gly	His	Ala	His	
		115					120					125				
tcg	gca	aac	ctt	cac	tgg	tac	aag	aag	atc	gac	ggc	gtc	tgg	aag	ttc	432
								Lys								
	130				•	135					140					
acc	aac	ctc	ลลฮ	ccc	gat	atc	cgc	tgg	ggc	gag	ttc	gac	ttt	gac	agg	480
								Trp								
145	Oly	Leu	Lys	110	150				,	155		•		•	160	
140					100					100						
								444	<b></b>	~~~	000		•			516
								ttt								010
Ile	Phe	Glu	Asp		Arg	Glu	Thr	Phe		Asp	Lys					
				165					170							

<210> 4

<211> 172

<212> PRT

<213> Pyricularia oryzae

<400> 4

Met Gly Ser Gln Val Gln Lys Ser Asp Glu Ile Thr Phe Ser Asp Tyr 6/11

1 5 10 15

Leu Gly Leu Met Thr Cys Val Tyr Glu Trp Ala Asp Ser Tyr Asp Ser
20 25 30

Lys Asp Trp Asp Arg Leu Arg Lys Val Ile Ala Pro Thr Leu Arg Ile 35 40 45

Asp Tyr Arg Ser Phe Leu Asp Lys Leu Trp Glu Ala Met Pro Ala Glu
50 55 60

Glu Phe Val Gly Met Val Ser Ser Lys Gln Val Leu Gly Asp Pro Thr
65 70 75 80

Leu Arg Thr Gln His Phe Ile Gly Gly Thr Arg Trp Glu Lys Val Ser 85 90 95

Glu Asp Glu Val Ile Gly Tyr His Gln Leu Arg Val Pro His Gln Arg 100 105 110

Tyr Lys Asp Thr Thr Met Lys Glu Val Thr Met Lys Gly His Ala His
115 120 125

Ser Ala Asn Leu His Trp Tyr Lys Lys Ile Asp Gly Val Trp Lys Phe 130 135 140

Ala Gly Leu Lys Pro Asp. Ile Arg Trp Gly Glu Phe Asp Phe Asp Arg
145 150 155 160

## WO 03/076628



Ile Phe Glu Asp Gly Arg Glu Thr Phe Gly Asp Lys
. 165 170

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gcagtgatac ccacaccaaa g

21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ttatttgtcg gcaaaggtct cc

22

## WO 03/076628

<210> 7	<2	21	0>	7
---------	----	----	----	---

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

agttcgaact ggaattcaac cggcacgcat gatgcatgca ttta

44

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

atgggttcgc aagttcaaaa g

21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



1	2	2	Λ	`
٧.	L	4	v	/

<223> Description of Artificial Sequence:primer

## <400> 9

gtggcccttc atggtgacct cct

23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

acaagctctg ggaggcaatg

20

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

atcgtcgacg tgaattcgtc ttgtaaaagc cgccaac 10/11

- <210> 12
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

 $\langle 223 \rangle$  Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ttcgtcggca tggtctcgag catctag

27



Internation optication No.
PC1/JP03/01980

A. CLASS Int.	A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48									
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
B. FIELDS	SEARCHED									
Int. C12N	Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19,  C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48									
	Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched									
CA(S	ata base consulted during the international search (name TN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG sProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/Gen	G), JSTPLUS FILE (JOIS)	ch terms used)							
C. DOCUI	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT									
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.							
A	MOTOYAMA T. et al., cDNA cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, Pyricularia oryzae., Biosci.Biotechnol.Biochem. 1998, Vol.62, No.3, pages 564 to 566									
A	NAKASAKO M. et al., Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibtion., Biochemistry 1998, Vol.37, pages 9931 to 9939									
·										
Furth	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.								
* Special categories of cited documents:  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filing date on the priority date and not in conflict with the application but cite understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention can document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention can considered novel or cannot be considered to involve an invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention that the principle or theory underlying the invention document of particular relevance.										
"O" docum means	cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  "O"  document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  "Y"  document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art									
Date of the	actual completion of the international search April, 2003 (17.04.03)	Date of mailing of the international sear 30 April, 2003 (30	ch report . 0 4 . 0 3 )							
	nailing address of the ISA/ anese Patent Office	Authorized officer								
Facsimile N	lo.	Telephone No.								

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int. Cl' C12N15/31, C12N15/60, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/48									
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int. Cl' Cl2N15/31, Cl2N15/60, C07K14/47, Cl2N1/15, Cl2N1/19, Cl2N1/21, Cl2N5/10, Cl2Q1/48									
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの									
国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語) CA(STN), BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUSファイル(JOIS) SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq									
C. 関連す	ると認められる文献		100 to 10						
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連すると	きは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号						
A									
NAKASAKO M. et al. Cryogenic X-ray crystal structure analysis for the complex of scytalone dehydratase of a rice blast fungus and its tight-binding inhibitor, carpropamid: the structural basis of tight-binding inhibition., Biochemistry 1998, Vol. 37, p. 9931-9939.									
□ C欄の続	きにも文献が列挙されている。	□ パテントファミリーに関する別	紙を参照。						
「A」特に関 もの 「E」国際出 以後に 「L」優先結 文 可 で 」ロ頭に	のカテゴリー 連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 願日前の出願または特許であるが、国際出願日 公表されたもの 主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 くは他の特別な理由を確立するために引用する 理由を付す) よる開示、使用、展示等に言及する文献 願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献							
国際調査を完了した日 17.04.03 国際調査報告の発送日 20.04.03									
日本	の名称及びあて先 国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 自							
	郵便番号100~8918 数千代用区録が関三丁月4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3488						